

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-179

(43) 公開日 平成7年(1995)1月6日

(51) Int. Cl.

C12N 1/20  
A01N 63/00  
63/02  
// C12P 21/00

識別記号

A 7236-4B  
E 7236-4B  
F 9155-4H  
E 9155-4H  
A 9282-4B

F I

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全13頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平4-19307

(22) 出願日

平成4年(1992)2月5日

(31) 優先権主張番号 特願平3-193810

(32) 優先日 平3(1991)8月2日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 000001052

株式会社クボタ

大阪府大阪市浪速区敷津東一丁目2番47号

(72) 発明者 大庭 道夫

福岡県福岡市東区箱崎5-4-12-1103

(72) 発明者 岩花 秀典

東京都町田市能ヶ谷町1521-44

(72) 発明者 佐藤 令一

東京都小金井市貫井北町3-2-22-37

小金井公務員住宅

(74) 代理人 弁理士 北村 修

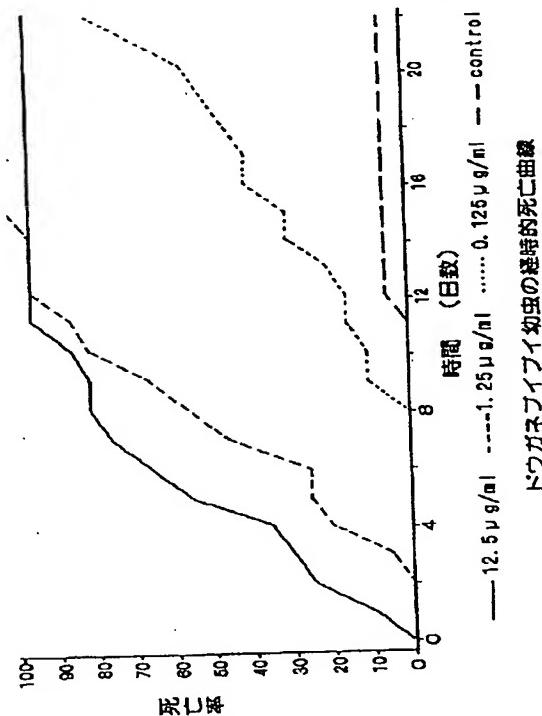
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規微生物及び殺虫剤

(57) 【要約】

【構成】 バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシスに属し、甲虫目幼虫に対する殺虫性毒素タンパク質を产生する能力を有するバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイ及びバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイが产生する毒素タンパク質を有効成分として含有する殺虫剤。

【効果】 本微生物は、従来のヤポネンシス株にはない甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫活性を示す結晶性タンパク質を生産するために、その生産した結晶性の毒素タンパク質を有効成分として含有する新規な微生物由來の殺虫剤を製剤することで、甲虫目幼虫に対する化学的に生産した殺虫剤よりも安全で安価なものとなる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシスに属し、甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫性毒素タンパク質を产生する能力を有するバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイ (微工研条寄第3465号)。

【請求項2】 バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイが产生する毒素タンパク質を有効成分として含有する殺虫剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス属に属する新規微生物及び新規微生物由来の殺虫剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス属で知られている菌株は、鱗翅目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質を产生するものが知られている。また、バチルス・チューリングンシス・サンディエゴ、バチルス・チューリングンシス・テネブリオニスの様に、ハムシの仲間、コロラドポテトビートルやゴミムシダマシの仲間チャイロコメノゴミムシダマシを殺すバチルス・チューリングンシス菌が知られている (J. Appl. Ent. 104(1987), 417-424)。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、ヤポネンシス属の菌株では鱗翅目昆虫の幼虫に対する殺虫性タンパク質以外の毒素タンパク質を产生するものが知られていないために、鱗翅目以外の他の昆虫に対する殺虫剤には利用できなかった。また、バチルス・チューリングンシス・サンディエゴ、バチルス・チューリングンシス・テネブリオニスなどは、シバ、サトイモ、サツマイモ、ラッカセイ等の大害虫であるドウガネブイブイの幼虫には殺虫効果がない。本発明者らは、バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス属に属する新菌種が、鱗翅目昆虫以外の甲虫目幼虫に対する殺虫性タンパク質を产生すること見出し、有効に利用できる新規微生物及び新規微生物由来の殺虫剤を提供することを目的とするものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明の新規微生物は、バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシスに属し、甲虫目幼虫に対する殺虫性毒素タンパク質を产生する能力を有するバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイに特徴を有する。そして、本発明のバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス属に属する新規微生物の1株であるバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイ (*Bacillus thuringiensis serovar japonensis strain Buibui*)は、微工

研条寄第3465号 (FERM BP-3465) として工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている。また、本発明の新規微生物由来の殺虫剤は、バチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイが产生する毒素タンパク質を有効成分として含有するものである。

## 【0005】

【作用】 以下に、本発明の新規微生物の菌学的性質を示す。

## 10 【菌学的性質】

## 1. 各培地における生育状態

本菌は、通常のバクテリアの培養に用いる事の出来る殆ど全ての培地に於いて生育が可能で、多少なりともトキシン蛋白を生産する事が出来る。図1、図2に示すごとくNYS, Lープロス、ブイヨン培地の代表的培地に於いて通常の生育を示した。即ち数時間で細胞数は対数的に増加し始め24時間で増加は止まった。トキシンは細胞数の増加にやや遅れ出現する。トキシン量は主バンド130kDaを計測すると、200~3000μg/m<sup>2</sup>培地である。適当な培地を探索することにより、Bt菌に於いて到達している5000μg/m<sup>2</sup>の生産量も可能である。

## 20 2. 形態学的性質

図3、図4に示すごとく、生じたコロニーは寒天培地上で表面に光沢を持ち、盛り上がりらず寒天表面に薄く広がり周囲が凹凸 (ラフ) の通常のバチルス菌の特徴を示す。コロニーの色はうすいベージュである。走査顕微鏡を用いて観察すると、図5、図6に示すようにバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス (以下ヤポネンシス株と略称する) 及びバチルス・チューリングンシス・セロバー・ヤポネンシス・ストレイン・ブイブイ (以下ブイブイ株と略称する) は共に球形の結晶蛋白が観察された。これらは鱗翅目幼虫に対して殺虫活性を示す他のBt菌によく見られるバイピラミッド型の結晶と異なるものである。

## 30 3. 生化学的性状

本菌であるブイブイ株の生化学的性状を、従来のヤポネンシス株と比較しながら次の各々の試験を行った。

## (試験例1) 鞭毛抗原に由来する抗体を用いたセロタ

## 40 イビング

バチルス属菌の持つ鞭毛の蛋白に対する抗体を用いて、未知の菌の鞭毛タンパク質を抗原として抗原抗体反応を利用し同定する用法である。ヤポネンシス株はセロタイビングによって、H23型に分類され既に公認されている亞種である (J. Invertebr. Pathol. 32, 303-309, 1978; J. Invertebr. Pathol. 48:129-130, 1986)。これに対し、ブイブイ株はヤポネンシス株のH抗原と反応する。そして、これらの性質は、ヤポネンシス株と血清学的に等しい。従って分類学上はヤポネンシス株と同亞種に属する。以下に実験の詳細を示す。

## (1) 鞭毛H血清の調整

バチルス・チューリングンシスの既知の40種類のH抗原基準株を用いた。Craigie管(0.5%半流動寒天培地)を用いて運動性の良好な細菌を選択し、それを用いてホルマリン死菌を作製し、これを家兔に免疫した。H血清はそれぞれの抗血清から相応するバチルス・チューリングンシス菌体抗原に対する抗体を吸収して調整した。菌体抗原は100度で加熱して鞭毛を剥離し調整した。

## (2) H抗原の同定

H抗原の血清型は、のせガラス凝集反応(Ohba and Aizawa, I. Invertebr. Pathol., 32, 303-309, 1978)によって同定した。またH血清の凝集素価は試験管凝集反応(Ohba and Aizawa, 1978)で定量した。

## (3) 結果

ヤポネンシス株は既知の40種類の鞭毛の抗体のみ含む標準血清の内Serovarjaponensis(H抗原23)の基準菌株に対する血清によってのみ特異的に凝集した。またブイブイ株に対するH血清は、ヤポネンシス株のみを特異的に凝集した。ヤポネンシスH血清の相応するホモの抗原に対する凝集素価は、12,800倍であり、ブイブイ株に対する凝集素価は6,400倍であった。ブイ

ヤポネンシス株とブイブイ株のドウガネブイブイに対する殺虫活性

トキシン投与量 ( $\mu\text{g}, 130\text{kDaタンパク}/\text{ml}$ )	死 亡 率 * %		
	7日目	14日目	22日目
<b>ブイブイ株 培養菌体</b>			
12.5	65	95	95
1.25	45	95	100
0.125	0	30	80
<b>ヤポネンシス株 培養菌体</b>			
100	0	0	0

\*供試虫数=1令幼虫20頭

【0007】

ヤポネンシス株とブイブイ株のいくつかの鱗翅目昆虫に対する殺虫活性

BBT2-8 10μg

供試虫の種類*	トキシン投与量 ( $\mu\text{g}, 130\text{kDaタンパク}/\text{ml}$ )	死 亡 率 * %	
		ブイブイ株	ヤポネンシス株
コナガ	50	0	100
ハスモンヨトウ	500	0	—
	50	0	4
チャノコカクモンハマキ	50	6	47
シロイチウモンヨトウ	50	10	3
カイコ	50	0	70

\*供試虫数=1~3令幼虫50頭

【0008】(試験例3) ヤポネンシス株及びブイブイ株の細胞中に蓄積する殺虫性蛋白質の電気泳動

ブイ株H血清のホモに対する凝集素価は、12,800倍であり、ヤポネンシス基準株に対する凝集素価は、6,400倍であった。従って、両菌株は同じ類と判断される。

(試験例2) ヤポネンシス株及びブイブイ株の生産する結晶蛋白の殺虫スペクトル

表1に示したように、ブイブイ株の生産する殺虫性蛋白は、甲虫目昆虫のドウガネブイブイ(*Anomala cuprea* H ope)に対して0.125~12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で殺虫効果を示したが、ヤポネンシス株の生産する殺虫性蛋白は、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でも殺虫活性を示さなかった。表2に示したように、ヤポネンシス株のものは、鱗翅目昆虫のうちコナガ(*Plutella xylostella*)、チャノコカクモンハマキ(*Adoxophyes* sp.)及び、カイコ(*Bombyx mori*)の幼虫に高い活性を示すが、一方ブイブイ株のものは、非常に低いか殆ど活性を示さなかった。これらの結果は両者の結晶性タンパク質が異なる組成を持っていることを示唆している。従って、両株は全く同一の菌株とは言えないことが判る。

【0006】

【表1】



ブイブイ株の培養液及び結晶タンパクの  
ドウガネブイブイに対する殺虫活性

トキシン投与量 (μg, 130kDaタンパク/ml)	死 亡 率		
	7日目	14日目	21日目
培 養 液	10	60	100
	1	40	95
結 晶 タン パク	10	50	100
	1	0	10
0.1	0	0	0

\*供試幼虫=1令20頭 菌体はNYSで培養

【0012】(試験例6) ブイブイ株の他の甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫効果

表5に示したようにブイブイ株はドウガネブイブイ以外にもヒメコガネ (*Anomala rufocuprea* Motschulsky), チビサクラコガネ (*Anomala schoenfeldti* Ohaus) に対しても高い殺虫活性を示した。従って他のいくつかのコ

ブイブイ株が生産する結晶タンパク質の  
チビサクラコガネ、ヒメコガネに対する殺虫活性

昆蟲名	トキシン投与量 (μg, 130kDaタンパク/ml)	死 亡 率					
		4.	7.	10.	14.	18.	21日目
チビサクラ コガネ	50	0	10	20	30	60	90
ヒメコガネ	50	0	10	20	30	60	100
ヒメコガネ 3令幼虫	50	0	10	30	30	70	90
コントロール	0	0	0	0	0	0	10

【0014】尚、ヒメコガネの3令幼虫以外は1令を用いた。結晶はNYSで培養した菌体から精製し、供試頭数は10である。上記コントロールとは、トキシンを与えないで水だけを与えた場合の結果(比較実験)を示すものである。

【0015】(試験例7) 他の甲虫目昆虫に対する殺虫効果

甲虫目アオドウガネ (*Anomala albopilosa*) の1令幼虫、サクラコガネ (*Anomala daimiana*) の1令幼虫、コガネムシ (*Minela splendens*) の1令幼虫、マメコガネ (*Popillia japonica*) の1令幼虫、セマダラコガネ (*Blitopertha orientalis*) の2令幼虫を用いてブイブイ株の各幼虫に対する殺虫活性を調査した。各供試虫は

野外より成虫を採集し、市販の腐葉土にて一時飼育し産卵させた卵より発生した幼虫の若い令のものを用いた。試験方法は160℃、60分ドライオーブンで乾熱滅菌した腐葉土を1グラム、容量約30mlの蓋付きプラスチックカップに秤量し、そこに所定の濃度のブイブイ培養物を混入して、充分攪拌して幼虫を1頭いたるもの複数用意し、これらを25℃恒温室で飼育し、7、14、21日後の死亡率を調査してブイブイの力値の検定を行う方法とした。

〔試験結果〕

【0016】

〔表6〕

幼虫名	(令期)	与えた毒素量 130kDaタンパク μg/g腐葉土	死亡率 (%)		
			7日後	14日後	21日後
アオドウガネ	1令	50 0.1	100 0	100 0	100 0
サクラコガネ	1令	50 0.1	0 25	50 25	70 25
コガネムシ	1令	50 0.1	100 0	100 100	100 100
マメコガネ	1令	50	100	100	100
セマダラコガネ	2令	50	100	100	100

【0017】サクラコガネ、セマダラコガネの供試虫数はそれぞれ8頭及び5頭であるが、他はすべて10頭である。

【0018】〔結論〕以上示したように、ブイブイ株はアオドウガネ、サクラコガネ、コガネムシ、マメコガネ、セマダラコガネに対して殺虫活性を示した。サクラコガネの場合21日後での死亡率は他の昆虫幼虫に比較して70%と、まだ低いが、体重の増加が全く見られず、この後死亡していくことは明らかである。従って多少の効果の遅延が観察されるものの、摂食の停止、死亡という効果は全く同等と判断できる。特にJapanese beetleと称してアメリカ合衆国で大問題となっているマメコガネに対する殺虫特性は特に重要である。以上いくつかの甲虫目に対する活性を特定したが、Anomala属以外にもPopillia, Minela, Blitopertha属にも対象が見出された事は、この菌の対象害虫が表5、表6に示した種のみに限定されるものではなくAnomala, Popillia, Minela, Blitopertha属で上記以外のもの、或いは広く上記以外の属の甲虫目昆虫にも及ぶことを示唆している。

#### ブイブイ株の培養培地中のベーターエキソトキンの活性 イエバエ幼虫に対する効果

		イエバエ幼虫の よう化率 (%) *	羽化率 (%)
ブイブイ培地		86.7	80
(標準ベーター エキソトキン)	0.2 ppm	90	0
	0.2 ppm	100	0
蒸留水		93.3	93.3

\*供試虫数 = 30

【0020】

【表8】

#### (試験例8) ベーターエキソトキンの活性

バチルス属の菌の中には、培地中にヌクレオチドの誘導体であるベーターエキソトキンを分泌する菌株もある。これはトキシン蛋白と同様に殺虫効果を有するものである。ベーターエキソトキンはイエバエの幼虫に対して催奇作用を示し、それを以てベーターエキソトキン活性の評価をしている。ところが、表7に示すように、常法に従ってブイブイ株の培地から培養上清を調整してイエバエに与えても、蛹化率羽化率ともに影響されず、ブイブイ株の催奇性は示されなかった。前記のブイブイ株の処理培地を、ドウガネブイブイに与えたところ、表8に示すように14日を経過しても幼虫は死ななかつた。この実験結果はドウガネブイブイに対するブイブイ株の殺虫効果はベーターエキソトキンに由来するものでないことを示している。つまり、ベーターエキソトキンは、前記の実験結果に影響を及ぼすほどには存在しないことが判る。

#### 【0019】

#### 【表7】

ブイブイ株を培養した培地の  
ドウガネブイブイに対する殺虫効果

	死亡率 (%)	
	7日目	14日目
ブイブイ培地	0	0
蒸留水	0	0

【0021】(尚、上記ブイブイ培地とは、培地から菌株を遠心分離により除去した残りの培地を示す。)

【0022】

【発明の効果】本発明の微生物の有効性は、これを培養することによって、従来のヤボネンシス株にはない甲虫目昆虫の幼虫に対する殺虫活性を示す結晶性タンパク質を生産し、その生産した結晶性の毒素タンパク質を有効成分として含有する新規な微生物由来で、甲虫目幼虫に選択的に活性を示す殺虫剤を製剤することで、化学的に生産した殺虫剤よりも安全性が高く安価なものとなる。

【0023】

【実施例】ブイブイ株は、Lープロスやヌートリエントプロス等の普通に細菌の培養に用いられる培地で容易に成育し、胞子、結晶蛋白を生産するが、ブイブイ株を培養して結晶タンパク質を含む殺虫成分を生産する上で、生産性の高い培地の検討を行った。先ず、9 cm シャーレの寒天培地に胞子  $3 \times 10^6$  個を接種して、10 日後に生産された結晶性タンパク質を顕微鏡観察した。その結果、次のように Lープロスに  $Mn SO_4$  ( $10^{-3}$  M) を添加した培地が最も生産がよく、以下の次のような順序であった。

Lープロス +  $Mn SO_4$  > スピチーゼン + アミノ酸 > Lープロス > PGSM > スピチーゼン + カザミノ酸 + ピタミン > スピチーゼン + カザミノ酸 > NYS > NYS + カザミノ酸

尚、各培地は以下のような組成を持っている。

Lープロス：各成分含量は 1 リットル当たり、トリプトース  $10\text{ g}$ 、酵母抽出物  $5\text{ g}$ 、食塩  $5\text{ g}$  で、pH = 7.18 ~ 7.2 である。

スピチーゼン：各成分含量は 1 リットル当たり、磷酸  $1\text{ g}$ 、水素カリウム  $14\text{ g}$ 、磷酸  $2\text{ g}$ 、硫酸  $6\text{ g}$ 、硫酸マグネシウム  $7 H_2O$   $0.2\text{ g}$ 、クエン酸ナトリウム  $1\text{ g}$ 、グルコース  $5\text{ g}$  で、pH = 7.0 である。

NYS：各成分含量は 1 リットル当たり、ヌートリエントプロス  $1.25\text{ g}$ 、トリプトン  $1.25\text{ g}$ 、酵母抽出物  $0.5\text{ g}$ 、塩化カルシウム  $2 H_2O$   $10.3\text{ g}$ 、塩化マグネシウム  $6 H_2O$   $20.35\text{ g}$ 、塩化マンガン  $4 H_2O$   $1.0\text{ g}$ 、硫酸鉄  $7 H_2O$   $0.02\text{ g}$ 、硫酸亜鉛  $7 H_2O$   $0.02\text{ g}$  で、pH = 7.2 である。

NYS + カザミノ酸：上記NYS培地にカザミノ酸  $2.0\text{ g}$  を加えた培地。pH = 7.2 である。

次に、本菌が生産する殺虫性結晶蛋白を用いた甲虫目昆

虫の幼虫に対する殺虫剤を製剤するにあたっては、本微生物を前述した種々の培地、あるいは魚粉、大豆粉等の固体培地を用いた培地、コーンシロップ、コンステイプなどの澱粉工業、製糖過程の廃棄物などを用いて培養し、この様な様々な方法で培養した菌体を、濃縮してクリーム状の物とし、これを水などに適当に希釈して散布するための殺虫剤にする。前記クリーム状の物には常法に従って防腐剤、增量剤などを混ぜてもよく、あるいは、この後にスプレードライヤーを用いて粉態にすることもできる。以上のような方法はトキシンタンパク質を生産している細胞そのものを用いて行うが、細胞が自己分解を起こすまで培養して結晶性のタンパク質のみを用いることもできる。結晶体の濃縮は遠心分離でも、膜を用いても行うことができる。この様に造られた製剤は当該菌が胞子を生産するために生菌製剤として用いることになる。本菌が生産する毒素蛋白は蚕に対する毒性を示さず、従って胞子を持った生菌製剤として用いても養蚕に対する打撃は全く無い生菌製剤である。また、適當な化合物を用いて、胞子を殺し死菌製剤として用いることも出来る。上記製剤を散布する方法に関して説明すると、対象とする甲虫目昆虫の幼虫は通常土壤中に生息しており、そのために、当該菌を有効成分とする殺虫剤は、土壤中に散布するか、もしくは腐葉土などと共に散布して直後に耕うん機などで鋤込むことが出来、また、直接散布して鋤込むこともできる。更に自動または手動の注射器様の器具を用いて、上記殺虫剤の懸濁液を、直接土壤中に注入することもでき、そのために、耕うん機等に全自動の注入器を設置してもよい。尚、前記ブイブイ株が生産するトキシンタンパク質は、そのタンパク質をコードする遺伝子を使って遺伝子工学的に作り出すこともできる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ブイブイ株の成長曲線を示すグラフ

【図2】ブイブイ株の成長曲線を示すグラフ

【図3】LB培地でのブイブイ株のコロニーを示す写真

【図4】各培地におけるブイブイ株のコロニーを示す写真

【図5】ヤボネンシス株の走査型電子顕微鏡写真

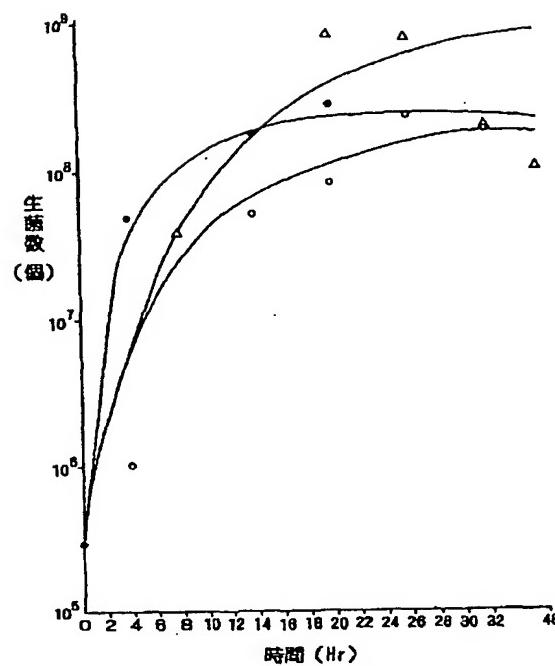
【図6】ブイブイ株の走査型電子顕微鏡写真

【図7】ナトリウムデシル硫酸ポリアクリルアマイドゲル電気泳動を示す写真

【図8】ドウガネブイブイ幼虫の経時的死亡曲線を示す

グラフ

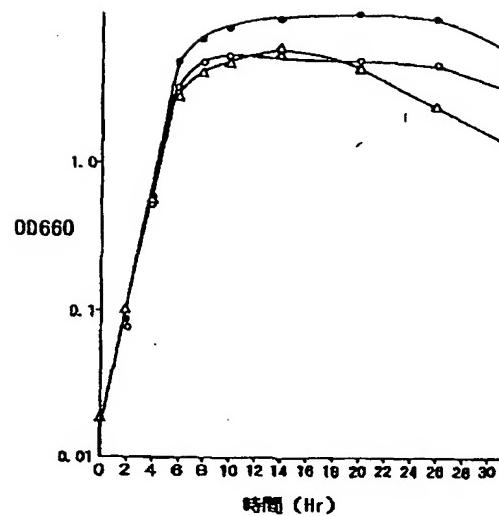
【図 1】



Pseudomonas aeruginosa growth curve

(細胞をシャーレの以下の選天培地に散布して生じたコロニー数を計測した。  
—●— LB 培地。 —○— NB 培地。 —△— NYS 培地)

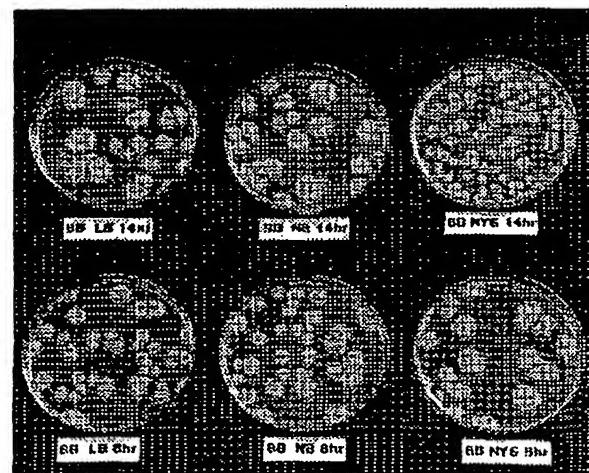
【図 2】



Pseudomonas aeruginosa growth curve

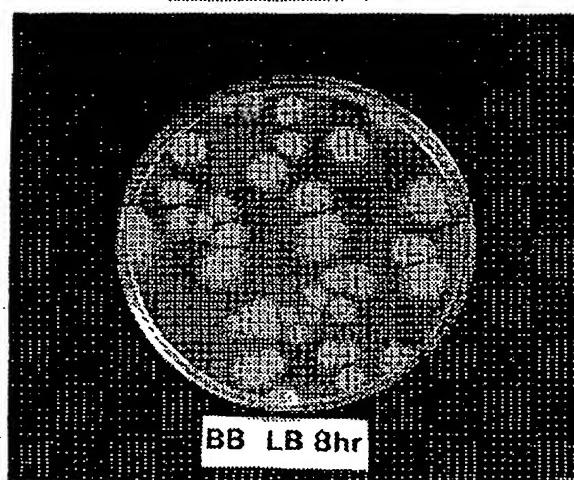
(細胞数の増加を培地の660 nmの吸収増加で表した。  
—●— LB 培地。 —○— NB 培地。 —△— NYS 培地)

【図 4】



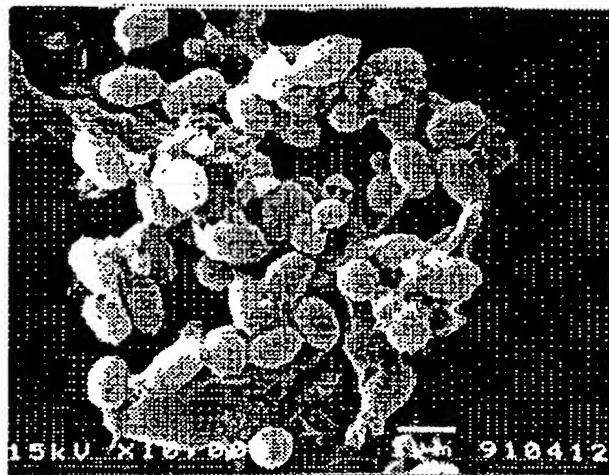
LB、NB、及びNYS培地で8時間及び14時間LB培地で静養したPseudomonas aeruginosaを各々の選天培地上で72時間培養した。

【図 3】



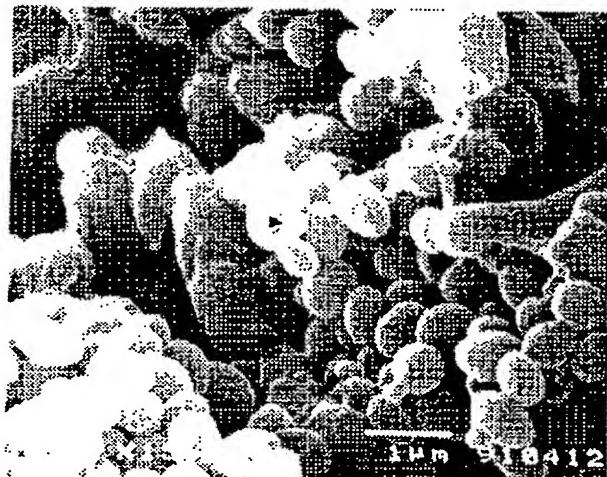
LB培地で8時間静養したPseudomonas aeruginosaを、LB選天培地上で72時間培養した。

【図5】



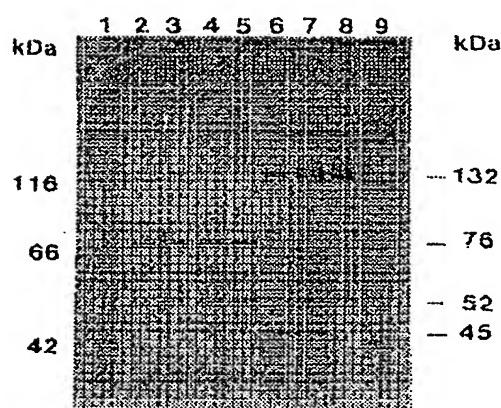
ヤボネンシス株の走査型電子顕微鏡写真  
▼、▼▼ 印紋トキシン蛋白の結晶を示す。膜中表面が  
しわの構造体は胞子である。

【図6】



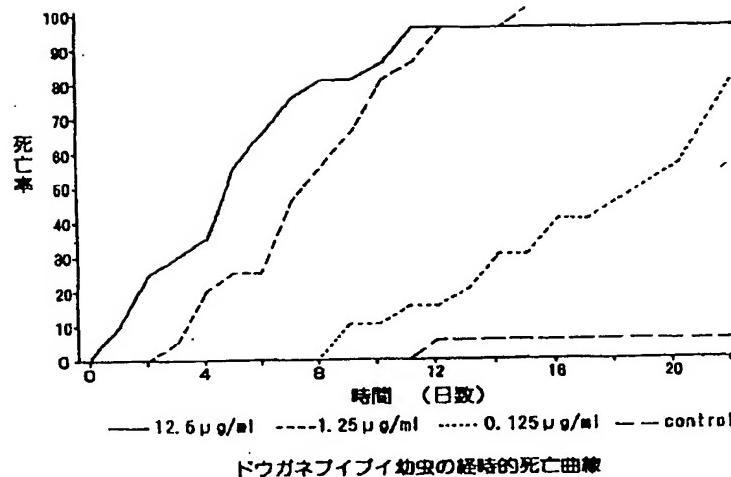
パイハイ株の走査型電子顕微鏡写真  
▼、▼▼、▼▼▼ 印紋トキシン蛋白の結晶を示す。膜中  
表面がしわの構造体は胞子である。

【図7】



- レーン1. 分子量マーク  
 レーン2. ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 5 µl  
 レーン3. ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 10 µl  
 レーン4. ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 15 µl  
 レーン5. ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 20 µl  
 レーン6. パイハイ株の生産するトキシン蛋白 5 µl  
 レーン7. パイハイ株の生産するトキシン蛋白 10 µl  
 レーン8. パイハイ株の生産するトキシン蛋白 15 µl  
 レーン9. 分子量マーク

【図 8】



## 【手続補正書】

【提出日】平成 4 年 2 月 5 日

## 【手続補正 1】

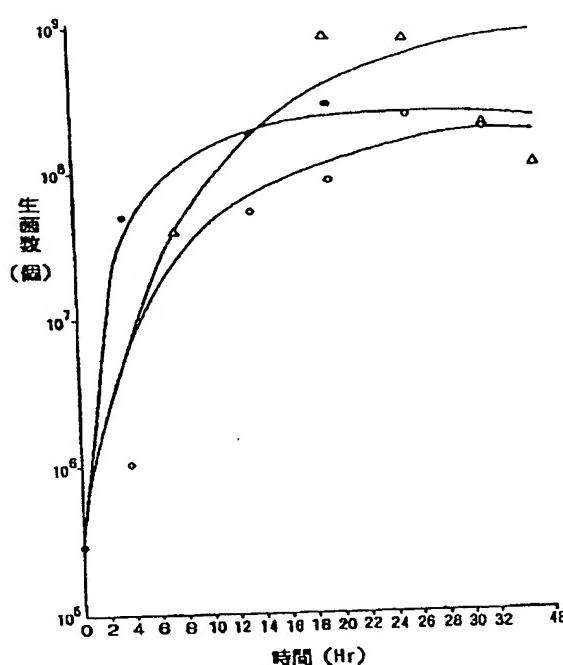
【補正対象書類名】図面

## 【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

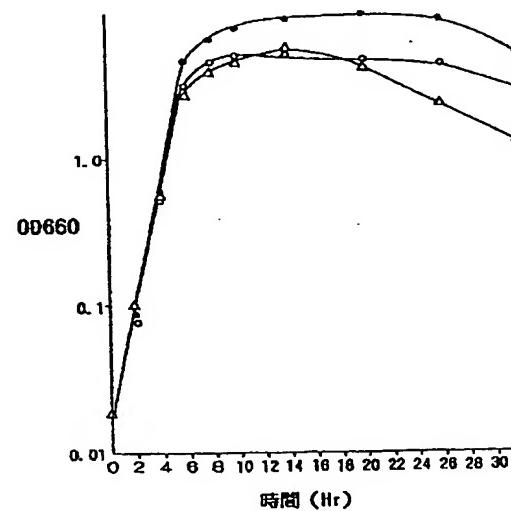
【図 1】



ブイブイ株の成長曲線

(細胞をシャーレの以下の寒天培地に散布して生じた)  
 □—□— LB 培地, ○—○— NB 培地, ▲—▲— NYS 培地

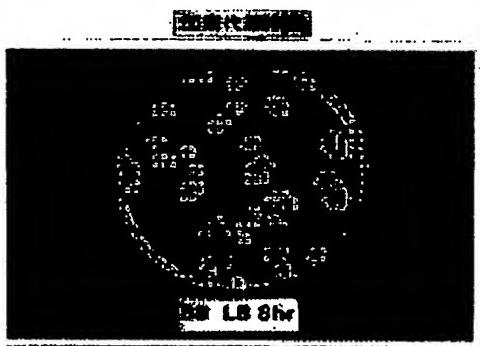
【図 2】



ブイブイ株の成長曲線

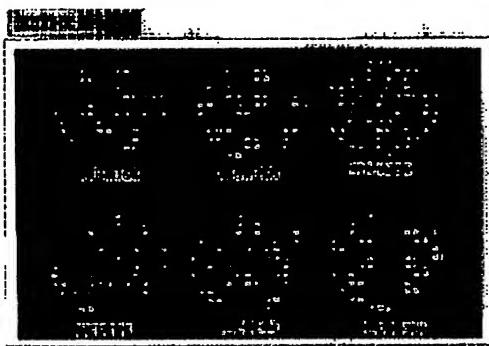
(細胞数の増加を培地の 660 nm の吸収増加で表した。  
 ●—●— LB 培地, ○—○— NB 培地, ▲—▲— NYS 培地)

【図3】



LB 培地で 8 時間飼培養したブイブイ株を、LB 培地  
培地上で 12 時間培養したコロニー。

【図4】



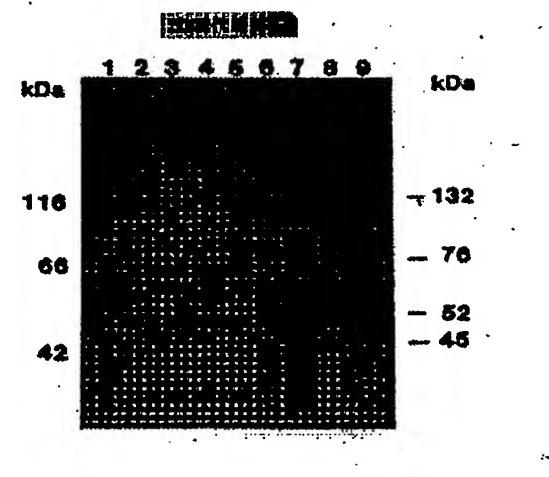
LB, NY 14 時間培養したブイブイ株を、  
培地上で 12 時間培養したブイブイ株を重ねて  
時間培養したコロニー。

【図5】



ヤボネンシス株の  
トキシンはトキシ  
ンの濃度は 100 μg/ml

【図7】



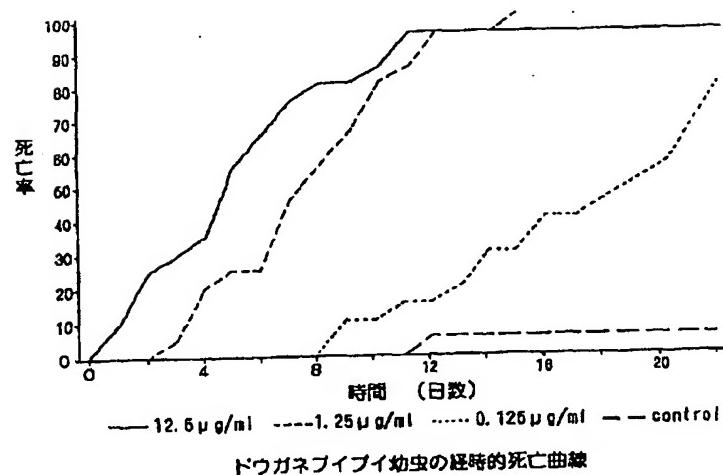
- |       |                    |
|-------|--------------------|
| レーン1. | 分子量マーカー            |
| レーン2. | ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 |
| レーン3. | ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 |
| レーン4. | ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 |
| レーン5. | ヤボネンシス株の生産するトキシン蛋白 |
| レーン6. | ブイブイ株の生産するトキシン蛋白   |
| レーン7. | ブイブイ株の生産するトキシン蛋白   |
| レーン8. | ブイブイ株の生産するトキシン蛋白   |
| レーン9. | 分子量マーカー            |

【図 6】



ブイブイ株の電顕顕微鏡写真  
▼、▼▼、▽、▽▽印はトキシン蛋白の結晶を示す。■は  
表面がしわの球円体は孢子である。

【図 8】



## 【手続補正書】

【提出日】平成 4 年 10 月 29 日

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1】ブイブイ株の成長曲線を示すグラフ

【図 2】ブイブイ株の成長曲線を示すグラフ

【図 3】生物の形態を示す写真

【図 4】生物の形態を示す写真

【図 5】生物の形態を示す走査型電子顕微鏡写真

【図 6】生物の形態を示す走査型電子顕微鏡写真

【図 7】電気泳動を示す写真

## 【図 8】ドウガネブイブイ幼虫の経時的死亡曲線を示す グラフ

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. \* 識別記号 F I  
(C12N 1/20  
C12R 1:07 )  
(C12P 21/00  
C12R 1:07 )

(72) 発明者 鈴木 伸和  
茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
(72) 発明者 萩原 克俊  
茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
(72) 発明者 坂中 一敦  
茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
(72) 発明者 堀 秀隆  
茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
(72) 発明者 浅野 昌司  
茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
ボタ技術開発研究所つくば研究室内  
(72) 発明者 河杉 忠昭  
茨城県竜ヶ崎市向陽台 5-6 株式会社ク  
ボタ技術開発研究所つくば研究室内